

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

FACULTÉ DE MÉDECINE

N° 67

MILIEUX VACCINÉS ET ANTIBIOTIQUES

LEUR ACTION SUR LES BACTERIES

THÈSE

présentée et publiquement soutenue devant

LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE MONTPELLIER

le 21 juillet 1952

par

JEAN COUSSERANS

Elève de l'Ecole du Service de Santé Militaire

Diplômé de Médecine exotique

Diplômé de Sérologie

pour obtenir le grade

DE DOCTEUR EN MÉDECINE

Examineurs
de la
Thèse

MM. CARRÈRE, Professeur, Président
PAGÈS, Professeur
JANBON, Professeur
PASSOUANT, Professeur agrégé

Assesseurs

MONTPELLIER
IMPRIMERIE COOPÉRATIVE L'ABEILLE
1952

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

FACULTÉ DE MÉDECINE

N° 67

MILIEUX VACCINÉS ET ANTIBIOTIQUES

LEUR ACTION SUR LES BACTERIES

THÈSE

présentée et publiquement soutenue devant

LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE MONTPELLIER

le 21 juillet 1952

par

JEAN COUSSERANS

Elève de l'Ecole du Service de Santé Militaire

Diplômé de Médecine exotique

Diplômé de Sérologie

pour obtenir le grade

DE DOCTEUR EN MÉDECINE



Examineurs
de la
Thèse

MM. CARRÈRE, Professeur, Président
PAGÈS, Professeur
JANBON, Professeur
PASSOUANT, Professeur agrégé

Assesseurs



MONTPELLIER

IMPRIMERIE COOPÉRATIVE L'ABEILLE

1952

MILIEUX VACCINÉS ET ANTIBIOTIQUES

LEUR ACTION SUR LES BACTERIES



A LA MÉMOIRE DE MES GRANDS PARENTS

A LA MÉMOIRE DE MES AINÉS DE L'ÉCOLE
DU SERVICE DE SANTÉ MILITAIRE,

morts au Champ d'Honneur.

A MON PÈRE ET A MA MÈRE,

Un faible témoignage d'amour et de profonde gratitude pour tout ce que je leur dois. Leur vie exemplaire sera toujours dans ma pensée et restera le guide de mon existence.

A MA FEMME,

Dont la tendresse est venue adoucir cette dernière année d'études.

A MES FRÈRES,

Qui trouveront toujours en moi l'affection et l'expérience de l'aîné.

A MON ONCLE,

LE MÉDECIN-GÉNÉRAL G. CHAUMET
PROFESSEUR AGRÉGÉ DU VAL-DE-GRACE

Il a été à l'origine de notre orientation vers les études médicales. Nous nous efforcerons de suivre l'exemple de sa brillante carrière.

A TOUS LES MIENS.

A MES AMIS.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR CARRÈRE,

*Qui nous a inspiré ce sujet de thèse et nous
a fait l'honneur d'en accepter la présidence.
Nous n'avons jamais cessé de bénéficier de
son expérience et nous avons trouvé en lui
l'aide la plus bienveillante.*

*Nous le prions de bien vouloir trouver ici
l'expression de notre respectueuse grati-
tude.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR PAGÈS,

*Son enseignement de la pathologie générale
nous a ouvert une multitude d'horizons
nouveaux.*

*Qu'il daigne trouver ici l'expression de notre
reconnaissance.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR JANBON,

*C'est dans son service que nous avons perfec-
tionné notre expérience clinique.*

*En témoignage de reconnaissance pour la
sympathie avec laquelle il nous a toujours
accueilli.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ PASSOUANT,

*Il a bien voulu faire partie de notre Jury de
thèse.*

Nous l'en remercions vivement.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ NÈGRE,

*Il nous a témoigné toute sa sympathie lors
de douloureuses circonstances.*

Qu'il soit assuré de notre profonde reconnaissance.

A MONSIEUR LE DOCTEUR ROUX,

*Il nous a toujours fait profiter de ses précieux
conseils et a mis à notre disposition les
moyens de travail nécessaires.*

Qu'il trouve ici l'expression de notre gratitude.

A MES MAITRES DES FACULTÉS DE MÉDECINE
DE MONTPELLIER ET DE LYON.

A MES MAITRES DES HOPITAUX CIVILS
ET MILITAIRES.

A MES CHEFS DE L'ÉCOLE DU SERVICE
DE SANTÉ MILITAIRE.

A MONSIEUR LE MÉDECIN-COMMANDANT
ESOURROU.

*En témoignage de reconnaissance pour la
sollicitude dont il nous a entouré.*

A MES CAMARADES DE L'ÉCOLE DU SERVICE
DE SANTÉ MILITAIRE.

MILIEUX VACCINÉS ET ANTIBIOTIQUES

LEUR ACTION SUR LES BACTÉRIES

INTRODUCTION

Pasteur, le premier en 1880, a découvert l'action inhibitrice exercée par les cultures filtrées d'un germe donné, sur les ensemencements du microbe homologue. Pour caractériser cette action, Pasteur employa le terme de « milieu vacciné » : il avait, en effet, remarqué que la culture du microbe du choléra des poules devenait rapidement impossible dans un bouillon où ce microbe avait antérieurement pullulé. Pasteur pensa qu'il s'agissait de l'épuisement du milieu en substances nutritives au cours de l'évolution vitale du germe. Il émit, alors, la théorie des manquants que d'ailleurs il refuta par la suite. Il convient de signaler que sur ces constatations ont été basées les premières études sur l'immunité.

Plus tard Roux et Chamberland, en 1888, reprirent ces faits en étudiant le charbon bactérien.

Ensuite ce furent les études de Freudenberg qui, la même année, vit la vaccination des milieux pour des germes hétérologues.

De nombreux travaux succédèrent aux précédents, parmi lesquels il convient de citer ceux :

— de Hajós, en 1922, qui esseyà de rapprocher le phénomène décrit par Pasteur du phénomène décrit par d'Heielle à propos des bactériophages.

— de Berdnikow, en 1926, qui tenta d'expliquer les modifications de la croissance des germes dans les filtrats de culture par des troubles de métabolisme azoté.

— de Aldershoff, en 1929, qui attribua la vaccination des milieux à la filtration sur bougie.

— de Besredka, en 1930, qui donna le nom d' « anti-virus » aux substances apparues dans les milieux de culture et qui s'opposent à la reproduction du germe homologue dans ces milieux.

Quelques rares travaux ultérieurs ne peuvent être passés sous silence, parmi eux, ceux de Mutwejewsky en 1930, de Bertarelli en 1931, d'Adrianus en 1922, de Schioppa en 1934, de Jandasek en 1949, de Delaunay en 1949 et de Moureau et Mollaret à la même époque. Ces travaux ne nous paraissent cependant pas apporter de faits nouveaux concernant la question.

Cette simple énumération montre que de nombreux auteurs ont été intéressés par cette question, combien est grande aussi sa complexité. Il est cependant à noter que depuis les travaux de Besredka qui, un moment, ont provoqué une recrudescence d'expériences, le sujet paraît avoir perdu de son intérêt.

L'apparition de nouveaux agents thérapeutiques antibactériens, aurait dû, nous semble-t-il, redonner un regain d'actualité à la découverte de Pasteur. Si l'on admet, en effet, la théorie des antiviruses de Besredka, quant au mode d'action des milieux vaccinés, on se rapproche étrangement des antibiotiques. D'après cet

auteur les substances élaborées et excrétées par la cellule microbienne dans le milieu, seraient la cause de l'inhibition de la croissance par action directe sur le germe, idée émise déjà par Pasteur qu'il résumait en cette phrase écrite en 1880, dans un compte rendu à l'Académie des Sciences : « Les excrétions nées d'un fonctionnement vital peuvent s'opposer à un fonctionnement vital de même nature ». N'est-ce pas là déjà, en puissance, la définition des antibiotiques. Pourquoi ne pas penser, alors, à étudier les rapports, qui, du point de vue synergie et antagonisme, pourront exister entre filtrats de culture et antibiotiques. Que peut donner cette association ? Les filtrats peuvent-ils sensibiliser certains germes particulièrement résistants aux antibiotiques ou au contraire, détruisent-ils cette sensibilité et augmentent-ils la résistance ?

Ce sont ces pourquoi qui nous ont incité à entreprendre notre étude.

Dans le bref exposé que nous avons fait sur les filtrats de culture, nous avons dit combien étaient divergentes les idées sur leur mode d'action ; aussi, toujours en faisant un parallèle avec les antibiotiques, avons-nous à notre tour essayé d'élucider le mécanisme des modifications subies par les germes ensemencés en milieux vaccinés.

Les travaux princeps de Tulasne et ceux de Carrère, sur les « corps larges » et les formes « L » nous ont conduit à rechercher en particulier si les modifications morphologiques provoquées chez les germes par les antibiotiques, se retrouvaient dans les filtrats et sur ces bases nous pensions pouvoir rapprocher l'action des deux substances. Or, Tulasne a montré que l'apparition des formes « L » sous antibiotiques se produisait ou du

moins était favorisée en milieu riche en protéines. Compte tenu de ce fait, nous avons ajouté du plasma comme substance enrichissante de nos milieux vaccinés ; des concentrations variables de plasma ont été distribuées dans les filtrats, ce qui nous a permis de trouver des résultats comparables aux résultats obtenus par cet auteur avec les antibiotiques.

Si les résultats sont identiques, peut-être les termes de passage ne sont-ils pas les mêmes, du moins c'est ce que nous ont suggéré nos expériences et il faudra, semble-t-il, modifier les données que nous avons sur le mode d'action des milieux vaccinés. C'est ce que nous tenterons de démontrer à la suite de notre expérimentation.

Ainsi apparaît tout le grand intérêt d'une étude approfondie des milieux vaccinés. Très important du point de vue bactériologique pur et peut-être du point de vue clinique sont les horizons nouveaux qu'ils nous ouvrent. Nous nous excusons ici de n'avoir pu fouiller davantage leur étude et nous le regrettons.

Quoiqu'il en soit nous nous proposons de consacrer un premier chapitre à l'expérimentation, chapitre qui sera lui-même subdivisé en deux sous-chapitres :

*A. — Milieux vaccinés et antibiotique.
Action sur le titrage.*

Dans cette partie nous étudierons d'abord la technique employée et nous passerons, ensuite, en revue l'association des cultures filtrées aux divers antibiotiques, en étudiant antibiotique par antibiotique, après avoir consacré un rapide exposé aux milieux vaccinés seuls.

B. — Action des milieux vaccinés sur la morphologie des germes. Parallèle avec l'action des antibiotiques.

Nous décrirons ici rapidement la technique utilisée et les modifications morphologiques des germes.

Un deuxième chapitre traitera des conclusions à tirer des deux phases de l'expérimentation. Ce sont les conclusions seules de l'expérience.

Et nous terminerons par les conclusions que nous suggère cette étude, ainsi que les hypothèses que nous pouvons en déduire.

CHAPITRE I

EXPÉRIENCES

A. — Milieux vaccinés et antibiotiques action sur le titrage

Technique générale

On sait combien la virulence de certains microbes pathogènes est fragile et avec quelle rapidité cette virulence baisse dans les cultures qui restent longtemps à l'étuve. Ce phénomène est attribué d'ordinaire au vieillissement des cultures.

En conséquence la technique de préparation des milieux vaccinés s'inspire-t-elle des conditions dans lesquelles ceux-ci commencent à prendre naissance, aussi nous sommes nous adressés à des cultures âgées non seulement en milieu liquide comme l'avait fait Besredka, mais également sur milieu solide.

Notre étude a porté sur trois germes : staphylocoque, *escherichia coli* et *proteus*.

Avant tout début d'expérience chaque germe a été soigneusement testé à divers antibiotiques.

La technique suivie doit être divisée en deux parties.

- une première partie concernant les milieux solides
- une deuxième partie réservée aux milieux liquides

I. — Milieux solides

Chaque germe est ensemencé sur gelose ordinaire en tube. Les milieux sont mis à l'étuve à 37 degrés pendant dix jours. Au bout de ce délai nous enlevons la pellicule de culture sur la surface du milieu, par lavages successifs à l'eau salée stérile. A ce lavage nous associons un nettoyage de la gelose avec des billes de verre stériles ou mieux un grattage doux à l'aide d'une pipette Pasteur fermée stérile qu'on peut beaucoup mieux guider que les billes et qui ne lèse pas la gélose.

Les tubes de milieux, ainsi débarrassés des germes, sont ensuite divisés en 2 lots : l'un servira aux études sans antibiotiques et l'autre après adjonction d'antibiotique.

Le premier lot des milieux ainsi préparés est ensemencé avec une goutte de culture de six heures sur bouillon ou eau peptonée, de germes homologues et hétérologues.

Les mêmes cultures de six heures mises sur gelose ordinaire constituent les témoins.

Nous avons choisi de préférence, des cultures de six heures, c'est-à-dire en phase logarithmique, phase où l'activité métabolique des individus jeunes est maximum.

Le deuxième lot de milieux, fondu par chauffage au bain-marie à 50° environ, est réparti dans cinq tubes pour chaque antibiotique, à raison de deux centimètres cubes par tube. L'antibiotique est alors ajouté dans le premier tube en partant d'une dose inférieure à la dose de sensibilité. Nous constituons dans les quatre autres tubes, une gamme de dilution identique à celle que l'on effectue pour le titrage de la résistance des germes aux antibiotiques selon la méthode des dilutions. Les tubes,

inclinés et refroidis, sont ensuite réensemencés comme précédemment avec des cultures de six heures de germes homologue et hétérologues.

Une gamme témoin des antibiotiques, en gélose ordinaire est faite avec les germes étudiés.

Le tout est ensuite porté à l'étuve à 37° pendant vingt-quatre heures et les résultats sont alors soigneusement notés.

Signalons ici que les milieux solides peuvent se vacciner en cinq à six jours. Mais une expérimentation rigoureuse nous a conduit à opérer toujours avec une culture de dix jours.

II. — *Milieux liquides*

Le milieu utilisé est le bouillon ordinaire que nous débarrassons de sa culture par simple filtration sur bougie Chamberland L 2 ou L 3, Nous avons ensuite adopté la même technique d'expérimentation que pour les milieux solides. De même que pour les cultures sur gélose il faudra opérer sur des quantités fixes de milieux lors de l'addition de l'antibiotique afin d'obtenir les dilutions successives rigoureusement exactes. Nous examinons également ici, l'action des filtrats sur le germe homologue et sur les germes hétérologues. Des témoins sont constitués comme précédemment, mais avec du bouillon ordinaire normal.

Nous terminons par une étude de la croissance des bactéries sur filtrat homologue associé à filtrat hétérologue à concentration variable: dans le filtrat homologue nous effectuons des dilutions de filtrat hétérologue selon la méthode des dilutions utilisée pour la recherche de la

résistance des germes aux antibiotiques, afin d'établir une gamme allant du 1/2 au 1/32. Le germe homologue est alors ensemencé sous forme d'une culture de six heures en bouillon ou eau peptonée. Une gamme témoin est effectuée sur bouillon ordinaire, avec le filtrat hétérologue.

Munis de ce plan de travail notre premier but sera l'étude rapide des milieux vaccinés sans antibiotiques. Après quoi nous passerons en revue l'influence sur les microbes de l'association de chaque antibiotique au milieu vacciné homologue et hétérologue. Nous terminerons par les résultats obtenus grâce à l'association des filtrats.

Les résultats donnés sont valables pour les milieux solides et liquides car ils sont exactement superposables.

Milieux vaccinés seuls

Chaque germe va être examiné séparément.

1) Milieu vacciné de *Staphylococcus* + germes homologues et hétérologues : *Bactérium coli* et *Proteus*

Nous constatons la vaccination du milieu pour le germe homologue et non pour les germes hétérologues. Notons qu'il est possible que le staphylocoque puisse redonner une certaine culture, mais ceci longtemps après l'ensemencement. La culture des germes hétérologues, en l'occurrence *Bactérium coli* et *Proteus*, est absolument comparable à celle de témoins faits sur gelose et bouillon normaux.

2) *Milieu vacciné d'Escherichia coli + germes homologue et hétérologues : Staphylocoque et Proteus*

Les mêmes constatations sont faites pour la culture du germe homologue. Mais ici nous observons une très légère inhibition de la culture par les germes hétérologues, par rapport à des témoins sur milieux ordinaires. Cependant cette différence est minime et il est difficile d'en tenir compte.

3) *Milieu vacciné de Proteus + germes homologue et hétérologues : Staphylocoque et Escherichia coli*

Pour un ensemencement de cultures de six heures le milieu vacciné ne se prête pas à la culture du microbe correspondant ni à celle des germes hétérologues : Escherichia coli et Staphylocoque. Il s'agit par conséquent d'un pouvoir inhibiteur pour les germes hétérologues comme l'ont décrit Freudenberg et Laval.

A noter cependant qu'avec un ensemencement âgé de vingt quatre heures les milieux où a poussé le Proteus n'arrivent pas à inhiber complètement un nouvel réensemencement avec ce dernier, mais il continue à inhiber le Bactérium coli et le Staphylocoque d'une façon toutefois moins totale.

Sur les maigres cultures des Proteus ayant poussé dans ce cas sur milieu solide nous avons vu apparaître une mutation du germe qui était primitivement sous forme « S » et qui semble pousser sur les milieux vaccinés sous forme « R ». Cependant il faut être prudent pour affirmer cette mutation car les souches « R » ne constituent pas la totalité de la culture.

Milieux vaccinés et antibiotiques

Pour la commodité de l'étude nous allons examiner antibiotique par antibiotique.

Technique

Nous expérimentons sur deux séries de cinq tubes de milieux vaccinés, l'une de milieu solide, l'autre de milieu liquide, contenant une quantité fixe de milieu soit deux centimètres cubes. Au premier tube est ajoutée une quantité d'antibiotique au plus égale à la moitié de la dose de sensibilité du germe étudié et nous effectuons des dilutions d'antibiotique à partir de ce tube suivant la technique utilisée dans le titrage de la résistance des germes par la méthode des dilutions. Une gamme témoin des antibiotiques est constituée sur gélo e et en bouillon ordinaires selon qu'il s'agit de milieu solide ou liquide. Ainsi nous éliminons toute cause d'erreurs. L'ensemencement est fait avec une goutte de culture de six heures sur bouillon ou eau peptonnée, de germes homologues et hétérologues.

I. — Penicilline et milieu vacciné de Staphylocoque

1) Staphylocoque.

Il est sensible à 65 Unités de penicilline par centimètre cube. La dose initiale de dilution est de 30 U par centimètre cube dans le premier tube, ce qui nous donne pour les cinq tubes une gamme contenant: 30 U - 15 U - 7,5 U - 3,75 U - 1, 88 U.

Résultats. — Il nous paraît que l'addition de pénicilline dans les conditions sus-décrites ne modifie aucunement les résultats obtenus avec les milieux vaccinés seuls pour le germe homologue. L'antibiotique se comporte comme absolument indifférent.

2) *Escherichia coli* et *Proteus*

Résultats. — Pour l'*Escherichia coli* mis sur milieu vacciné de Staphylocoque contenant 30 Unités de pénicilline par centimètre cube on note une légère mais nette inhibition de la croissance. Peut-être est-ce dû à une action antipenicillinase du Staphylocoque car on sait que le bactérium *coli* secrète une pénicillinase qui expliquerait l'insensibilité de ce dernier à la penicilline.

— Pour les *Proteus* au contraire il semble que la même quantité d'antibiotique ajoutée au milieu provoquerait une action favorisante pour ce germe. Ceci d'ailleurs est assez souvent noté en clinique.

II. — *Streptomycine*

1) Streptomycine et milieu vacciné de Bactérium *coli*.

a) *Escherichia coli*

Il est sensible à 12 γ de streptomycine par centimètre cube. La dose initiale de dilution est de 5 γ dans le premier tube ce qui nous donne pour les cinq tubes ensemencés une gamme contenant : 5 γ - 2,5 γ - 1,25 γ - 0,62 γ - 0,31 γ .

Résultats. — Aucune modification n'est à noter par rapport aux milieux vaccinés sans antibiotique. Il n'y a pas de changement dans la propriété abiotique du milieu vacciné.

b) Staphylocoque et Proteus

Résultats. — Le *Proteus* sensible à 12 γ de streptomycine par centimètre cube voit sa culture nettement diminuée sur un milieu vacciné de *Bactérium coli* contenant 2,5 γ de streptomycine par centimètre cube.

— Quant au *Staphylocoque* qui est normalement résistant à la streptomycine, il voit sa culture pratiquement réduite à zéro sur milieu vacciné d'*Eschérichia coli* dans lequel nous avons mis 2,5 γ de streptomycine. Ce fait est à retenir et nous tenterons de l'expliquer dans les conclusions.

2) Streptomycine et milieu vacciné de *Proteus*

a) Proteus

Il est sensible à 12 γ de streptomycine par centimètre cube. La dose initiale de dilution est de 5 γ par centimètre cube dans le premier tube ce qui nous donne pour les cinq tubes une gamme contenant : 5 γ - 2,5 γ - 1,25 γ - 0,62 γ - 0,31.

Résultats. — Sur les milieux vaccinés de *Proteus*ensemencés avec une culture jeune de six heures, les résultats sont identiques à ceux obtenus dans les milieux vaccinés seuls. L'antibiotique est indifférent.

Mais avec un ensemencement fait à partir de culture de vingt-quatre heures qui, nous l'avons vu, donnait une légère culture sur le milieu vacciné seul, nous constatons ici une inhibition complète de la croissance. Il semble donc y avoir synergie entre la streptomycine et le milieu vacciné.

b) Escherichia coli et Staphylocoque

Résultats. — Avec ces germes mis sur milieu vacciné de *Proteus* associé à la streptomycine à concentration de 2,5 γ par centimètre cube, nous ne constatons aucune modification par rapport au milieu sans antibiotique ensemencé avec des cultures de six heures, mais avec un ensemencement âgé de vingt-quatre heures, qui donne une légère culture, nous trouvons une inhibition totale malgré la faible dose de streptomycine utilisée.

*III. — Chloromycetine et milieu vacciné
d'Escherichia coli*

I) *Escherichia coli*

Il est sensible à 60 γ de chloromycetine par centimètre cube. La dose initiale de dilution est de 30 γ par centimètre cube dans le premier tube ce qui donne pour les cinq tubes utilisés une gamme contenant : 30 γ - 15 γ - 7,5 γ - 3,75 γ - 1,88 γ .

Résultats. — L'association de chloromycetine au milieu vacciné fournit un résultat identique à celui que nous avons obtenu pour les milieux vaccinés purs : inhibition complète de la culture.

2) *Proteus et Staphylocoque*

Résultats. — L'ensemencement de ces deux microbes sur un milieu où a poussé le *Bactérium coli*, associé à la chloromycetine à concentration de 30 γ par centimètre cube nous donne ce qui suit :

— La culture de *Proteus* est à peu près nulle bien qu'existante. Il semblerait donc y avoir une action associée au filtrat et de l'antibiotique.

Quant au Staphylocoque nous notons ici une culture diminuée par rapport à celle de l'ensemencement sur milieu sans antibiotique, mais elle est cependant plus importante que la culture donnée par les *Proteus*.

IV. — Auréomycine et milieu vacciné de *Proteus*

1) *Proteus*

Il est sensible à 125 γ d'auréomycine par centimètre cube. La dilution initiale est de 60 γ par centimètre cube dans le premier tube ce qui donne dans les cinq tubes ensemencés, une gamme contenant : 60 γ - 30 γ - 15 γ - 7,5 γ - 3,75 γ .

Résultats. — Par des réensemencements de *Proteus* de six heures sur milieu vacciné homologue, on se trouve devant des résultats identiques à ceux décrits dans les milieux sans antibiotique. Mais avec des réensemencements de vingt-quatre heures, où nous avons noté une légère culture, de fortes concentrations d'auréomycine (60 γ) se comportent comme indifférentes alors que des doses plus faibles (15 γ) semblent posséder une légère action inhibitrice.

2) *Escherichia coli* et Staphylocoque

Résultats. — Les ensemencements de six heures de ces deux germes sur milieu vacciné de *Proteus* associé à l'auréomycine à concentration de 60 γ par centimètre cube ne donne aucune culture. Mais sur les cultures de vingt quatre l'action de l'association du milieu vacciné de *Proteus* à l'auréomycine est plus faible que l'inhibition obtenue avec l'association de ce même milieu à la streptomycine : La croissance n'est pas totalement inhibée bien que nettement diminuée par rapport à ce qui a été vu dans les milieux sans antibiotique.

V. — Terramycine

1) Terramycine et milieu vacciné de Staphylocoque

a) *Staphylocoque*

Il est sensible à 250 γ de terramycine par centimètre cube. La dilution initiale d'antibiotique est de 125 γ par centimètre cube dans le premier tube ce qui donne dans les cinq tubes utilisés une gamme contenant : 125 γ - 62,5 γ - 31 γ - 15 γ - 7,5 γ .

Résultats. — La terramycine donne des résultats comparables à ceux de la pénicilline. L'antibiotique ne modifie en rien les propriétés du milieu vacciné de Staphylocoque pour le germe homologue.

b) *Escherichia coli* et *Proteus*

Résultats. — L'ensemencement de ces microbes sur milieu vacciné du Staphylocoque associé à la terramycine à concentration de 125 γ par centimètre cube nous donne une inhibition presque totale de leur croissance. Le phénomène est particulièrement net pour *Escherichia coli*.

A noter qu'*Escherichia coli* était sensible à 500 γ de terramycine par centimètre cube et le *Proteus* résistant à plus de 1000 γ .

2) Terramycine et milieu vacciné d'*Escherichia coli*

a) *Escherechia coli*

Il est sensible à 500 γ de terramycine par centimètre cube. La dose initiale de dilution est de 125 γ par

centimètre cube dans le premier tube, ce qui donne pour les cinq tubesensemencés une gamme contenant : 125 γ - 62,5 γ - 31 γ - 15 γ - 7,5 γ .

Résultats. — Nous retrouvons ce que nous avons déjà vu avec la streptomycine sur milieu vacciné homologue du germe. Il n'y a aucune action décelable de l'antibiotique : absence totale de culture.

b) *Proteus* et *Staphylocoque*

Résultats — La mise en culture de ces deux germes sur le milieu vacciné de *Bactérium coli* associé à la terramycine à concentration de 60 γ par centimètre cube nous donne les résultats suivants :

— mêmes constatations que celles faites avec *Proteus*ensemencé sur milieu vacciné de *Bactérium coli* : c'est à dire une légère inhibition de la culture.

— Quant au staphylocoque les résultats sont également identiques : léger arrêt de la croissance.

3) Terramycine et milieu vacciné de *Proteus*

a) *Proteus*

Il est résistant à plus de 1000 γ de terramycine par centimètre cube. La concentration initiale d'antibiotique est de 125 γ par centimètre cube dans le premier tube ce qui nous donne pour les cinq tubesensemencés une gamme contenant : 125 γ - 62,5 γ - 31 γ - 15 γ - 7,5 γ .

Résultats — Il sont très peu modifiés par rapport à ceux obtenus avec les milieux sans antibiotique. Il semble que la terramycine soit indifférente à n'importe

quelle dose pour le milieu vacciné de proteus ensemencé avec une culture de six heures de ce même germe, alors qu'on note une légère action inhibitrice de l'antibiotique pour le milieu ensemencé avec une culture de vingt quatre heures.

b) Escherichia coli et Staphylocoque

Résultats. — Quant à l'action du milieu vacciné de Proteus associé à la terramycine à la dose de 125 γ par centimètre cube, les résultats sont exactement superposables à ceux obtenus avec l'association de ce même milieu à la streptomycine sur des cultures de six heures de ces deux germes. Toutefois sur des cultures de vingt quatre heures l'action est moins nette que celle obtenue avec la streptomycine associée au milieu vacciné de proteus : il n'y a pas arrêt total de la culture.

Association de filtrats

Technique

Le filtrat homologue est réparti dans cinq tubes sous volume de deux centimètres cubes. Nous ajoutons du filtrat hétérologue à des dilutions allant du 1/2 au 1/32 selon la méthode des dilutions utilisée pour tester la résistance des germes aux antibiotiques.

Une gamme témoin est constituée avec du bouillon ordinaire réparti à raison de deux centimètres cubes par tube et auquel on ajoute les mêmes dilutions de filtrat hétérologue allant du 1/2 au 1/32.

I. — Association
de filtrat d'*Escherichia coli* (homologue)
et de filtrat de *Staphylocoque* (hétérologue)

Le filtrat de base est celui de *Bactérium coli* dans lequel le filtrat de *Staphylocoque* est dilué dans des proportions allant du $1/2$ au $1/32$ selon la technique précédemment décrite. On ensemence l'association avec une goutte de culture jeune de six heures d'*Escherichia coli*.

Résultats. — On note ici une nette action empêchante de l'association des deux filtrats sur la propriété abiotique du bouillon où a cultivé *Escherichia coli*. Il est à remarquer cependant que cette action va en décroissant avec les doses de filtrat de *Staphylocoque* ajoutées.

Il semblerait qu'*Escherichia coli* pousse avec les fortes concentrations de filtrat de *Staphylocoque* vraisemblablement pour deux raisons :

— d'abord celui-ci dilué le filtrat de *Bactérium coli* et par conséquent la substance empêchante ou « antiviral » si antiviral il y a.

— Ensuite parce que très certainement il apporte des substances de croissance au *Bactérium coli*.

II. — Association de filtrat de *Proteus* (homologue)
et filtrat de *Staphylocoque* (hétérologue)

Le filtrat de base est celui de *Proteus* dans lequel le filtrat de *Staphylocoque* est dilué dans des proportions allant du $1/2$ au $1/32$. Une goutte de culture jeune de six heures de *Proteus* est ensemencée sur l'association.

Résultats. — Les résultats sont beaucoup moins nets que pour *Escherichia coli*. Il ne semble pas y avoir de grandes modifications dans la manière de réagir au milieu vacciné de *proteus*. Peut-être est-ce du à l'action *empêchante polymicrobienne* du filtrat de ce microbe.

Tableau récapitulatif

MILIEUX	Staphylocoque	Escherichia Coli	Proteus
Milieus vaccinés par :			
Staphylocoque	—	+++++	+++++
E. Coli	—	++	++
Proteus (6 h.)	—	—	—
— (24 h.)	++	++	++
Milieus vaccins de staphylocoque			
+ Pénicilliné : 30 U	—	++++	+++++
15 U	—	++++	+++++
7,5 U	—	+++++	+++++
3,75 U	—	+++++	+++++
1,88 U	—	+++++	+++++
Milieu vacciné de B. Coli			
+ Streptomycine. 5 γ	+	—	++
2,5 γ	+	—	++
1,25 γ	++	—	++
0,62 γ	++	—	++
0,31 γ	++	—	++
Milieu vacciné de Proteus (6h)			
+ Streptomycine. 5 γ	—	—	—
2,5 γ	—	—	—
1,25 γ	—	—	—
0,62 γ	—	—	—
0,31 γ	—	—	—

MILIEUX	Staphylocoque	Eschirichia Coli	Proteus
Milieu vacciné de Proteus (24 h.)			
+ Streptomycine 5 γ	—	—	—
2,5 γ	—	—	—
1,25 γ	—	—	—
0,62 γ	+	+	+
0,31 γ	+	+	+
Milieu vacciné de Staphylo- coque			
+ Terramycine, 125 γ	—	+	+
62,5 γ	—	+++	+++
31 γ	—	+++	+++
15 γ	—	+++	+++
7,5 γ	—	+++	++++
Milieu vacciné de B. Coli			
+ Terramycine 125 γ	+++	—	+++
62,5 γ	+++	—	+++
31 γ	+++	—	+++
15 γ	+++	—	+++
7,5 γ	+++	—	+++
Milieu vacciné de Proteus (6h)			
+ Terramycine. 125 γ	—	—	—
62,5 γ	—	—	—
31 γ	—	—	—
15 γ	—	—	—
7,5 γ	—	—	—
Milieu vacciné de Proteus (24 h.)			
+ Terramycine 125 γ	+	+	+
62,5 γ	+	+	+
31 γ	+	+	+
15 γ	+	+	+
7,5 γ	+	+	+

MILIEUX	Staphylocoque	Escherichia Coli	Proteus
Milieu vacciné de Proteus (6h)			
+ Aureomycine. 60 γ	—	—	—
30 γ	—	—	—
15 γ	—	—	—
7,5 γ	—	—	—
3,75 γ	—	—	—
Milieu vacciné de Proteus (24 h.)			
+ Aureomycine. 60 γ	+	+	+++
30 γ	+	+	+++
15 γ	+	+	+
7,5 γ	+	+	+
3,75 γ	+	+	+
Milieu vacciné de B. Coli			
+ Chloromycétine. 30 γ	+++	—	+
15 γ	+++	—	+
7,5 γ	+++	—	+
3,75 γ	+++	—	+++
1,88 γ	+++	—	+++
Filtrat de B. Coli			
+ filtrat de staphylocoque à concentration de 1/2		+++	
1/4	non fait	+++	non fait
1/8		+	
1/16		+	
1/32		±	

MILIEUX	Staphylocoque	Eschirichia Coli	Proteus
Filtrat de Proteus + filtrat de staphylocoque à concentration de			
1/2	non fait	non fait	+
1/4			+
1/8			+
1/16			+
1/32			+

N. B. — + + + + = Culture identique à témoin.
 ± = Culture douteuse.
 — = Pas de culture.

B. — Action du milieu vacciné sur la morphologie des microbes parallèle avec l'action des antibiotiques.

Les dernières publications de Tulasne sur les formes "L" et les corps globuleux comme les travaux du Pr. Carrère au laboratoire de microbiologie nous ont suggéré l'idée de rechercher s'il y avait similitude d'action des cultures filtrées et des antibiotiques sur la morphologie des microbes.

Pour cette expérimentation nous avons choisi le filtrat de proteus en raison, nous l'avons dit ailleurs, de son pouvoir empêchant non seulement pour le germe homologue mais aussi pour les germes hétérologues.

Talusne, dans ses publications, insiste sur le fait que les formes "L" n'apparaissent le plus souvent qu'en milieu riche en protéines. Ce qui nous a conduit à ajouter du plasma humain ou équin à nos milieux vacciné pour favoriser, si possible, la formation des corps globuleux et leur évolution en forme de "L".

Notre expérimentation est divisée en trois parties distinctes :

Dans une première phase, nous recherchons l'action modificatrice des milieux vaccinés purs, sur la morphologie des germes homologues et hétérologues.

Une deuxième phase est consacrée à l'étude de l'action des filtrats de culture additionnés de plasma sur la morphologie des microbes correspondants et hétérologues.

Dans une troisième nous avons poursuivi l'expérimentation par les essais de culture des formes "L" et les corps lages obtenus, reportés sur milieu normal afin de connaître si les formes "L" en particulier, peuvent redonner des formes normales.

Toutes nos observations : l'étude morphologique des germes et de leurs modifications, ont été faites au microscope à contraste de phase.

Action des milieux vaccinés purs sur la morphologie des germes

Des cultures jeunes de six heures en bouillon d'*Eschérichia coli* et de *proteus* sontensemencées sur filtrat de culture de dix jours de *Proteus* et portés à l'étuve à 37°. Nous pratiquons ensuite l'examen des cultures à diversées phases.

Résultats

1) Six heures après l'ensemencement aucune culture décelable à l'œil n'apparaît dans aucun des tubes. Cependant dans une goutte de milieu examinée entre lame et lamelle au microscope à contraste de phase, apparaissent de nombreuses formes microbiennes altérées aussi bien chez le *Proteus* que chez le

Bactérium coli et surtout nous constatons l'immobilisation totale de ces deux germes qui étaient auparavant d'une très grande mobilité.

2) Un nouvel examen entre lame et lamelle au microscope à contraste de phase, pratiqué dix-huit heures après donne les résultats suivants :

a) *Proteus* sur filtrat homologue,

Les constatations faites sont à peu près les mêmes que celles du premier examen : tous les germes sont immobilisés et présentent de légères modifications de structure : germes granuleux chromatine fragmentée - germes à condensation chromatique bipolaire. (*figure 1*).

b) *Escherichia coli* sur filtrat de *Proteus*.

Une différence très nette apparaît dès mise au point d'une préparation. Non seulement les bactéries sont toutes immobiles mais ici leur évolution est poussée jusqu'à un degré assez élevé : presque tous les microbes visibles dans le champ présentent une structure non homogène beaucoup plus accentuée que ce que nous avons vu antérieurement pour le *Proteus*. En outre, nous trouvons ici de très nombreuses formes filamenteuses avec présence, dans le protoplasme, de formations qui sont très probablement des noyaux, formes exactement semblable à celles qui sont produites par l'action des antibiotiques : c'est la bactériostase. Ici, de plus, apparaît un début de formation de corps globuleux objectivé par le fait que de nombreux germes présentent soit un étranglement en leur milieu avec masses condensées opposées — aspect en haltère — soit un gonflement "swelling" (*figure 2*).

3) Ces constatations faites nous avons, deux jours après, pratiqué un nouvel examen, entre lame et lamelle au microscope à contraste de phase, portant sur les deux ensemencements précédents, ce qui nous a permis de noter l'évolution des aspects morphologiques des germes : alors que les premiers examens décèlent une faible proportion de germes en voie de transformation, il nous a été difficile de détecter de rares bacilles d'aspect normal la culture étant presque totalement constituée par des corps globuleux en amas ressemblant à un véritable tissu de cellules avec noyau, protoplasme plus ou moins granuleux, membrane évoquant à notre esprit les formations décrites sous le nom de "mycetomes" par Paillot chez les pucerons verts du rosier. Nous avons essayé de reproduire cet aspect par les schémas 3 et 4.

De plus en variant la mise au point nous avons trouvé de véritables semis de formes "L" imprégnant absolument toute la préparation. Une simple différence de densité expliquerait nous semble-t-il, le fait que les formes "L" ne puissent être vues sur le même plan que les corps globuleux. Ce n'est d'ailleurs là qu'une question de détail mais qu'il nous a paru bon de signaler.

Adjonction de plasma équin aux cultures filtrées de *Proteus*

I. — *Adjonction de plasma dès avant l'ensemencement* *Technique*

Dans deux séries de six tubes contenant chacun un centimètre cube de filtrat de culture de *Proteus* de dix jours, nous effectuons, dans chacune, des dilutions de



Figure 1



Figure 2

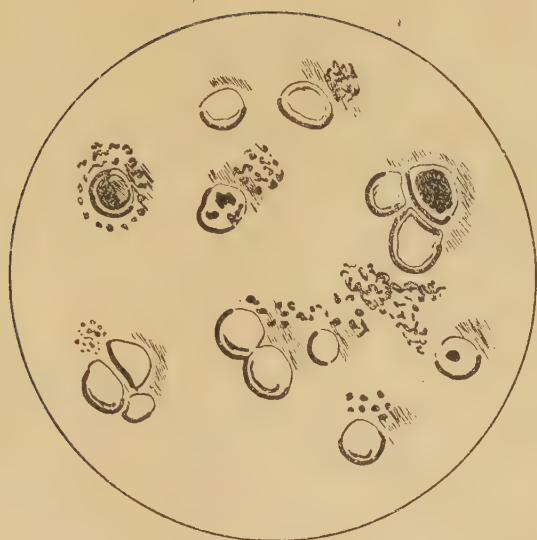


Figure 3

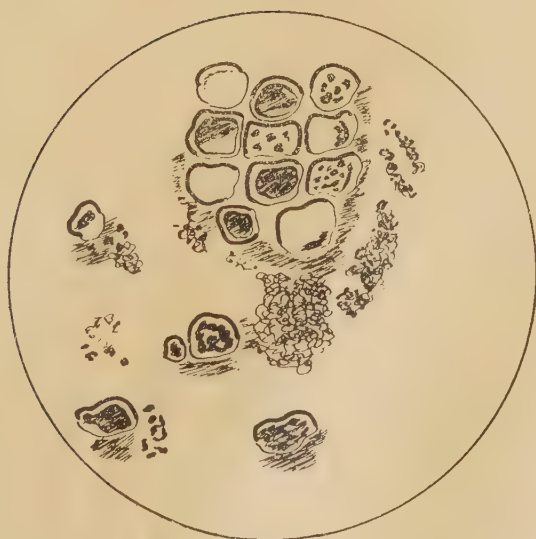


Figure 4

plasma de cheval allant du $1/3$ au $1/96$ selon la méthode des dilutions utilisées pour le titrage de la résistance des germes aux antibiotiques. Les deux séries de tubes sont ensuite ensemencées l'une avec une goutte de culture de six heures de *Proteus* dans chaque tube, l'autre avec une goutte de culture de six heures d'*Escherichia coli*. Nous procédons, également ici, à plusieurs examens entre lame et lamelle, au microscope à contraste de phase, à divers stades de l'évolution des germes.

Rappelons que le plasma n'est distribué dans nos filtrats que dans le seul but d'enrichir le milieu en protéines, Nous espérons ainsi hâter la formation de corps globuleux.

Un premier examen six heures après l'ensemencement ne décèle pas de modifications plus importantes que celles vues dans les filtrats de *proteus* sans plasma, mais à la dix-huitième heure nous notons les résultats suivants :

Résultats

1) Proteus sur filtrat homologue + plasma.

a) Dans les tubes contenant des dilutions de plasma allant du $1/3$ au $1/24$:

A l'examen microscopique le milieu paraît optiquement vide, mais dans les préparations entre lame et lamelle, examinées au microscope à contraste de phase, on reconnaît la présence de toutes les formes de transition entre les germes normaux et les formes «L» : corps microbiens granuleux — bacilles à condensation

chromatique bipolaire avec centre clair — nombreuses formes en haltère — et prédominance de corps globuleux pleins ou paraissant vides, groupés en amas. Les formes «L» libres, multiples, sont souvent situées sur des plans différents de ceux des corps globuleux comme nous l'avons signalé antérieurement. On obtient donc un aspect identique à celui que nous avons figuré dans les schémas 3 et 4.

b) Au 1/48 le milieu est toujours clair, mais les corps globuleux sont beaucoup plus dispersés et moins nombreux bien que présentant encore une certaine densité par rapport aux formes normales.

c) Au 1/96 le milieu est nettement trouble. Il semble bien qu'il s'agit d'une culture normale. Le plasma, à ce faible taux, paraît avoir une action favorisante pour les germes que l'on retrouve à l'examen microscopique ayant un aspect absolument normal — formes bacillaires de 2 à 5 microns — et souvent mobiles.

En nous basant sur les résultats fournis par plusieurs examens, il semble que la dose de plasma la plus favorable à l'apparition de corps larges et de formes «L», est située dans une zone de dilution allant de 20 % à 5 %.

2) *Eschérichia coli* sur filtrat de *Proteus* + plasma

a) En utilisant des dilutions de plasma allant du 1/3 au 1/12 nous notons de nombreuses formes évolutives identiques à celles du *Proteus*, mais cependant les corps globuleux paraissent en nombre moindre. Le milieu reste clair.

b) au 1/24 le milieu reste clair mais les corps globuleux sont plus rares et la note dominante est donnée surtout par la bactériostase.

c) au 1/96 les constations sont les mêmes que celles qui ont été faites pour le proteus et d'ailleurs les milieux sont ici légèrement troubles également. Cependant il semblerait que les formes évolutives soient plus nombreuses que pour le bacille précédent.

II. — Adjonction de 10 % de plasma equin douze heures après l'ensemencement

Technique

Deux séries de trois tubes contenant un centimètre cube de culture de Proteus de dix jours filtrée sont ensemencées, l'une avec une goutte de culture de six heures d'*Escherichia coli*, l'autre avec une goutte de culture de même âge de Proteus.

Après douze heures de séjour à l'étuve à 37° les milieux sont examinés entre lame et lamelle au microscope à contraste de phase.

Résultats

1) Pour *Escherichia coli* on note de nombreuses modifications des germes, modifications qui sont, probablement, le début de formation de corps globuleux : bacilles étranglés en leur milieu — fragmentation chromatique.

2) Pour le Proteus, il y a surtout immobilisation des bacilles et pour certains d'entre eux, un début d'évolution dans le sens décrit pour le *Bactérium coli*.

Les milieux sont alors additionnés de plasma de cheval à la concentration de 10 % et mis à l'étuve à 37°.

Six heures après, un nouvel examen pratiqué entre lame et lamelle, au microscope à contraste de phase, donne :

1) *Proleus* :

Quelques corps globuleux présentant ici la forme particulière semblable à un mononucléaire : masse de chromatine centrale — étroite zone claire parsemée de granulations — le tout entouré d'une membrane très distincte.

2) *Escherichia Coli*.

Les mêmes constatations peuvent être faites pour ce germe.

Ensemencement de formes « L » sur milieu normal.

Ayant obtenu des formes « L » il nous a paru intéressant de rechercher si ces formes reportées sur milieu normal donnaient naissance à des formes bactériennes normales ou se conservaient en formes « L ». Tulasne a en effet signalé cette possibilité en transférant les formes « L » en milieu sans pénicilline. Ce retour à la forme initiale, s'il se vérifie, présente aussi bien, du point de vue bactériologique que du point de vue clinique un intérêt majeur. Peut-être, permettrait-il en effet d'expliquer une modalité des rechutes au cours des maladies infectieuses, les typhoïdes par exemple, rechutes qui ne sont pas rares dans ces affections depuis l'instauration du traitement au chloramphénicol : D'un pourcentage

initial de 15 % avant la découverte des nouveaux antibactériens, nous passons à celui de 30 à 40 % après traitement antibiotique. Le chloramphénicol provoquerait la formation des corps globuleux donnant naissance aux formes « L » pouvant demeurer à ce stade ou disparaître, d'où dans le premier cas guérison apparente, peut-être même définitive, ou rechute si le retour à la forme bactérienne initiale se produit.

Ce seul exemple, parmi de nombreux autres, nous a incité à entreprendre les essais suivants :

Les formes « L » et les corps globuleux obtenus par l'association filtrat de *Proteus* + plasma à forte concentration (de 1/3 à 1/24), c'est-à-dire contenant une grande proportion de formes évolutives, ont été portées dans une série de milieux normaux : bouillon ordinaire et gelose semi-molle, à raison de deux gouttes pour deux centimètres cubes de milieux.

Nos ensemencements ont été surveillés quotidiennement afin de dépister la moindre trace de culture. Au bout de dix jours les tubes ensemencés paraissaient optiquement vides. Toutefois, après agitation, on voit apparaître dans les tubes l'un des deux aspects décrits par Tulasne à propos des colonies de formes « L », immergées en milieu liquide : soit des agglomérats blanchâtres de la grosseur d'une tête d'épingle qui se mettent en suspension à l'agitation soit en louche très léger qui a tendance à se déposer au fond du tube quand cesse l'agitation.

Par contre, quand on part de filtrats contenant de faibles dilutions de plasma (1/96) et où par conséquent les corps globuleux sont absents, mais où existent les

germes en évolution à côté de formes normales et mobiles, lesensemencements étant faits dans les conditions précédemment décrites, on obtient les résultats suivants :

Comme il était prévisible, une culture abondante de bacteries apparemment normales est obtenue, provenant évidemment des germes normaux, mais très probablement aussi des germes inhibés ou incomplètement évolués vers les corps globuleux, qui ont repris leur potentiel de reproduction des formes normales, alors que dans la première experience, l'évolution des corps globuleux et des formes " L " était trop avancée pour permettre le retour aux formes normales.

CHAPITRE II

CONCLUSIONS DE L'EXPÉRIMENTATION

Après l'exposé des faits qui a été l'objet du chapitre I il convient de tirer les premières conclusions de notre expérimentation. Nous envisagerons successivement les résultats obtenus avec les milieux vaccinés seuls ou associés entre eux, ensuite avec les milieux vaccinés associés antibiotiques et pour terminer nous étudierons l'action des filtrats de culture sur la morphologie microbienne.

Ces déductions expérimentales seront complétées par un chapitre spécial apportant les conclusions générales et hypothèses suggérées par notre étude.

I. — Milieux vaccinés seuls ou associés entre eux

1) *Milieux vaccinés seuls*

Les faits observés peuvent se résumer ainsi :

a) Ils apportent une vérification des observations antérieures faites par de nombreux auteurs, c'est-à-dire l'impossibilité d'une culture seconde dans un milieu où un germe homologue a auparavant cultivé.

b) Constatation d'une légère action inhibitrice du filtrat d'*Escherichia coli* pour le *Proteus* et le *Staphylococcus*, soit par disparition de facteurs de croissance

nécessaires à ces germes et communs avec ceux du bactérium coli qui a « vacciné » le milieu, soit par une véritable action d'antagonisme microbien.

c) Un point intéressant : Si des cultures de *Proteus* âgées de six heures sontensemencées en filtrat homologue on n'observe aucun développement : il en est d'ailleurs de même pour les autres germes (*Escherichia coli*, *Staphylocoque*).

Mais si l'ensemencement est fait à partir de cultures âgées de vingt quatre heures on obtient une certaine croissance des microbes : il semble que les bactéries âgées de vingt quatre heures, c'est-à-dire évolueront vers la phase de croissance maximum, donnent une culture car elles n'ont plus besoin à cette phase de certains facteurs de division qui leur étaient nécessaires en phase logarithmique (culture de six heures). Leur métabolisme tend vers sa phase maximum et peut-être leur exoenzymes sont-elles capables de synthétiser les facteurs nécessaires à la division et à la continuation de la croissance, à partir des matériaux du milieu.

La même observation peut-être faite pour *Escherichia coli* et le *Staphylocoque*ensemencés sur filtrat de *Proteus* : Des cultures de six heures ne donnent aucune croissance probablement pour la même raison que nous avons émise au sujet de l'action inhibitrice du filtrat d'*Escherichia coli*, mais ici il y a inhibition complète, alors que des cultures de vingt quatre heures donnent une culture légère identique à celle du germe homologue.

2) *Milieux vaccinés associés entre eux*

a) Filtrat d'*Escherichia coli* + filtrat de *Staphylocoque*ensemencés avec *Escherichia coli*

Nous avons vu que par ce mélange on obtenait une action empêchante du pouvoir abiotique du milieu vacciné

par le Bactérium coli vis-à-vis du germe homologue. Cependant, cette action s'atténue avec la diminution des doses de filtrat de Staphylocoque ajoutées. Il y a là un argument assez important en faveur de l'hypothèse de l'épuisement du milieu vacciné : le filtrat de Staphylocoque apporterait au filtrat de Bactérium coli des facteurs de croissance essentiels qui permettraient la culture du Bactérium coli. Ceci démontre aussi que, dans un milieu de culture, le Staphylocoque n'utilise probablement pas les mêmes substances que le Bactérium coli, laissant ainsi disponibles les métabolites essentiels de croissance pour le germe. Ce qui explique le fait que plus la concentration de filtrat de Staphylocoque est grande, plus importante est la croissance d'Escherichia coli.

b) Filtrat de Proteus + filtrat de Staphylocoque
ensemencés avec du Proteus

L'action favorisante pour le Proteus est moins nette que dans l'expérience avec Escherichia coli, peut être parce que le Proteus exige pour le départ des cultures des métabolites que n'apporte pas le filtrat de Staphylocoque, ce qui peut aussi laisser supposer que dans un même milieu, Proteus et Staphylocoque, utilisent les mêmes substances nécessaires pour leurs métabolismes.

Quoi qu'il en soit le filtrat de Staphylocoque n'a pas d'action favorisante pour la culture du Proteus filtrat homologue.

II. — Milieux vaccinés et antibiotiques

A. — Germe homologue du milieu vacciné

Nous avons vu que l'adjonction d'un antibiotique, ne modifie pas d'une façon sensible la propriété abiotique

des milieux vaccinés. Rappelons toutefois le phénomène de synergie observé avec le *Proteus* ensemencé sur milieu correspondant : nous avons vu qu'une culture de vingt-quatre heures de cette bactérie ensemencée en filtrat homologue donne une légère croissance et que si la streptomycine, à une dose bien inférieure à la dose de sensibilité du germe, est associée, on obtient l'inhibition complète de toute croissance. On peut penser que cette synergie d'association résulte d'une part de la destruction de certains facteurs métaboliques par la culture première de *Proteus* et d'autre part du blocage par la streptomycine des chaînes de réactions enzymatiques encore possibles, malgré la carence des milieux vaccinés en métabolites, permettant un certain degré de croît.

B. — Germes hétérologues du milieu vacciné

Nous pouvons faire quelques constatations. Pour cela nous étudierons, comme dans l'expérimentation, successivement l'action de chaque antibiotique.

1) Penicilline et filtrat de Staphylocoque

a) La mise en culture, dans un tel mélange, d'*Escherichia coli* qui est normalement résistant à la pénicilline nous montre une inhibition nette. Cette inhibition est assez délicate à interpréter : ou bien il s'agit d'une action antipenicillinase du Staphylocoque (bien que le Staphylocoque élabore souvent des penicillinases) bloquant la pénicillinase du *Bactérium coli*, ou bien d'une substitution métabolique.

b) Quant au *Proteus*, dans le mélange penicilline-filtrat de Staphylocoque, bien au contraire, sa croissance paraît être favorisée par la pénicilline. Ce fait, constaté

en clinique, s'explique facilement en admettant, ce qui est probable, que la pénicilline apporte, par certains de ses constituants des facteurs de croissance pour le proteus.

2) Streptomycine

a) *Streptomycine et filtrat de Bactérium coli*

Le Proteus qui est sensible à 12 γ de streptomycine est pratiquement inhibé par l'association filtrat de bactérium coli — streptomycine à la dose de 2,5 γ par centimètre cube. Il y a donc ici, également, synergie entre le filtrat et l'antibiotique. L'explication serait la même que celle que nous avons donnée pour le Bactérium coli ensemencé en pénicilline + filtrat de Staphylocoque, bien que l'on n'ait pas isolé de streptomycinase. Il est vraisemblable qu'il y a action synergique par blocage de métabolites différents.

Pour le Staphylocoque nous obtenons les mêmes résultats, mais le fait est plus frappant car ce coccus est absolument insensible à la streptomycine. Il semblerait que le manque de certains facteurs essentiels sensibiliserait ce germe à la streptomycine.

b) *Streptomycine et filtrat de Proteus*

Deux sortes de résultats sont ici à mentionner :

Pour un ensemencement, pratiqué à partir de cultures d'Escherichia coli et de Staphylocoque âgées de six heures aucune modification par rapport au milieu vacciné pur.

Mais pour un ensemencement pratiqué à partir de cultures de vingt-quatre heures de ces mêmes germes,

la streptomycine, à raison de 2,5 γ par centimètre cube donne une nette action empêchante et nous émettons l'hypothèse que l'action combinée du filtrat de *Proteus* et de la streptomycine sur les métabolites, telle que nous l'avons expliquée plus haut, permettrait l'inhibition des deux microbes.

3) Terramycine

a) *Terramycine et filtrat de Staphylocoque*

La croissance d'*Escherichia coli* et du *Proteus* est arrêtée probablement pour la même raison que nous avons avancée plus haut : action synergique au filtrat de *Staphylocoque* et de l'antibiotique sur les métabolites indispensables aux deux germes.

b) *Terramycine et filtrat d'Escherichia coli*

L'antibiotique semble ici ne pas posséder une grande action sur les cultures de *Proteus* et de *Staphylocoque*. Peut-être la terramycine agirait-elle en inhibant les réactions enzymatiques libérant les mêmes métabolites qui seraient absents du milieu vacciné.

c) *Terramycine et filtrat de Proteus*

Pour les ensemencements pratiqués à partir d'une culture de six heures d'*Escherichia coli* et de *Staphylocoque*, les résultats sont semblables à ceux obtenus en expérimentant avec le filtrat par homologue.

Par contre, quand les ensemencements sont pratiqués à partir de cultures de vingt-quatre heures on constate une inhibition moins nette que l'inhibition obtenue

avec la streptomycine. Ce fait est très probablement dû à ce que la terramycine n'agit pas sur les métabolites qui sont bloqués ou détruits par la streptomycine.

3) Aureomycine et filtrat de *Proteus*

L'ensemencement de *Bactérium coli* et de *Staphylocoque* pratiqué sur ce mélange, autorise les déductions précédemment apportées au sujet de la terramycine.

5) Chloromycétine et filtrat d'*Escherichia coli*

Il semble y avoir ici également synergie de cette association sur les ensemencements de *Proteus* et de *Staphylocoque* pratiqués dans ce mélange pour les raisons indiquées précédemment.

III. — Action des milieux vaccinés sur la morphologie des microbes

A. — Action des milieux vaccinés purs

L'expérimentation est effectuée sur filtrat de *Proteus* ensemencé avec germes homologue et heterologue : *Escherichia coli*. Nous examinons les ensemencements entre lame et lamelle au microscope avec dispositif de contraste de phase.

La bactériostase est la première action des milieux vaccinés sur les germes. Les microbes, d'une mobilité extrême, avant leur mise en culture en filtrat de *Proteus*, perdent rapidement leur mobilité et ne présentent aucun signe de division cellulaire. Lentement, ensuite, nous assistons à divers stades évolutifs de ces microorganismes. On observe les termes de passage qui paraissent être identiques à ceux décrits à propos de l'action

des antibiotiques : des formes filamenteuses, plus ou moins longues, multinuclées, des corps globuleux à divers stades formatifs ou à maturité, des formes « L » tels que les ont décrit Klieneberger - Nobel - Tulasne - Minck - Dienes.

Il faut cependant souligner le fait que les formes « L » commencent à se manifester beaucoup plus tardivement que sous l'action des antibiotiques. Mentionnons également la plus grande sensibilité d'*Escherichia coli*, décelée dix huit heures après l'ensemencement sur filtrat de *Proteus*.

B. — Action des milieux vaccinés associés au plasma equin

Nos expériences ont aussi porté sur le *Proteus* et le *Bactérium coli* ensemencés en filtrat de *Proteus* : les constatations faites sont à peu près superposables pour les deux microbes.

I. — Adjonction de plasma dès l'ensemencement

1) Filtrat de Proteus et fortes concentrations de plasma : 1/3 au 1/48

D'après Tulasne l'apparition de formes « L » est très favorisée par l'adjonction au milieu de protéines (sérum plasma). De fait l'apport de protéines, grâce à des quantités importantes de plasma, nous a permis de constater la formation de nombreux corps globuleux généralement en amas. Ce qui confirme les observations de Tulasne faites avec les antibiotiques, De même la rapidité de formation des formes « L » est grandement augmentée si on compare aux témoins constitués par des milieux vaccinés purs. Il y a donc une action nettement favorisante

du plasma, non sur le mécanisme formatif de ces formes, mais surtout sur leur vitesse d'évolution : en dix-huit heures nous obtenons les mêmes résultats que nous donnent en trois jours les milieux vaccinés purs.

Ouvrons une parenthèse pour dire ici que les formes « L » semblent être des formes « adaptatives » et non des germes de résistance.

2) *Filtrat de Proteus et faible concentration
de plasma 1/96*

Ces faibles concentrations de plasma ne fournissent pas de quantités suffisantes de protéines pour faire apparaître les corps globuleux et les formes « L » mais par contre ces petites doses de substances protéiques favorisent la croissance des bactéries sous leur forme habituelle s'opposant ainsi à l'action inhibitrice et inductrice du filtrat pur. Cette constatation paraît donc favorable à l'hypothèse de l'existence dans le plasma de plusieurs facteurs qui auraient des actions antagonistes, les uns favorisant le croît des formes normales des bactéries, les autres complétant l'action inductrice modificatrice du filtrat.

L'action bactériostatique des milieux vaccinés est due à une absence de facteurs de croissance, de multiplication ; la confirmation en est apportée par les deux constatations suivantes :

— croissance plus rapide des germes sous forme bactérienne dans les milieux vaccinés additionnés de petites quantités de plasma

— absence de formes évolutives dans ces milieux.

Il apparaît donc que le plasma n'agit qu'en apportant un ou plusieurs facteurs de croissance, qui provoquent

et favorisent la culture des microbes ensemencés et empêchent leur évolution vers les formes anormales.

II. — Adjonction de plasma douze heures après l'ensemencement

C'est la confirmation de l'expérience précédente. L'action modificatrice des filtrats se fait à nouveau jour et nous retrouvons aussi l'action favorisante du plasma sur la vitesse de formation des corps globuleux. Les déductions précédentes sont également valables ici.

IV. — Ensemencement des formes « L » sur milieu normal

Tulasne a insisté sur le fait que les formes « L » peuvent redonner des formes bactériennes en milieu normal sans pénicilline.

Dans notre expérimentation nous vérifions tout d'abord les aspects décrits par cet auteur pour les cultures de formes « L » immergées en milieu liquide. D'autre part, malgré tout le soin que nous avons apporté à nos expériences nous n'avons pu obtenir des formes bactériennes à partir des formes « L » ensemencées sur milieu normal. Il semble donc, au premier abord, que les formes « L » sont ces formes évolutives irréversibles. En réalité nous pensons tout autrement : les formes « L » sont des organismes possédant des possibilités évolutives très diminuées à tel point que Tulasne en fait des formes de résistance. Or il est démontré que des microorganismes, à métabolisme ralenti, ne peuvent dégrader les protéines afin d'en retenir les acides aminés indispensables à leur croissance. L'apport simple d'acides aminés permettrait, peut-être, le départ de la culture ; les

germes pourraient alors utiliser les protéines non scindées : Elles doivent être rompues en chaînons courts. Or les enzymes responsables de ces ruptures sont des exo-enzymes qui ne sont évidemment secrétées que par des germes en prolifération, ainsi, pouvons-nous comprendre pourquoi les formes « L » reportées sur milieu normal ne peuvent redonner des formes bactériennes. Il serait très intéressant de voir si un ensemencement de ces formes évolutives sur milieu synthétique ou du moins sur milieu contenant divers acides aminés libres et non des protéines entières, donnerait, ce que nous croyons possible, des formes bactériennes normales.

CHAPITRE III

CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET HYPOTHÈSES

I. — Mode d'action des milieux vaccinés

De cette étude semble résulter le fait que les milieux de culture se « vaccinent » non seulement par apparition de substances nouvelles inhibitrices comme l'a vu Besredka, mais aussi et, peut-être, surtout, par disparition de substances antérieurement présentes comme le pensait Pasteur.

Les arguments relevés en faveur de cette hypothèse sont les suivants :

— La synergie dans certains cas, du milieu vacciné et de l'antibiotique peut-être expliquée par le fait que le filtrat de culture a perdu certains métabolites essentiels antérieurement utilisés par les premiers germes pour leur croissance. L'antibiotique ajoute son action empêchante en rendant d'autres métabolites inutilisables par blocage des chaînes des réactions enzymatiques indispensables à la reproduction microbienne.

— Quand l'action de l'association filtrat et antibiotique est nulle, c'est-à-dire, quand l'apport de l'antibiotique n'amène aucune variation d'effet du filtrat lui-même, il est possible de penser que l'antibiotique a perdu des points d'attaque du fait de la disparition des métabolites

essentiels (facteur de départ ou de croissance) sur lesquels porte son action.

— L'association à un filtrat d'un filtrat hétérologue favorise la culture de la bactérie homologue par apport de substances manquantes.

— Le plasma en petites quantités agit de même par apport de substances de croissance et dans ces conditions, il n'est pas inducteur d'évolution en corps larges : la culture donne des bactéries normales.

Ainsi les faits observés permettent de conclure que la théorie des « antiviruses » de Besredka n'est pas absolue et en tout cas ne s'oppose pas à la théorie des manquants de Pasteur. Très probablement les « milieux vaccinés » sont inhibiteurs à la fois par des substances empêchantes par elles-mêmes et par le manque de facteurs essentiels de départ ou de croissance consommés lors de la culture primitive.

Il paraît cependant que l'absence de métabolites essentiels a un effet plus important que l'effet produit par la substance anti.

Si l'on compare l'action des filtrats et l'action des antibiotiques on est amené à conclure à une identité partielle en ce qui concerne justement le pouvoir empêchant, abiotique, d'un filtrat vis-à-vis du germe homologue (cas habituels) et surtout vis-à-vis d'un germe hétérologue (cas du *Proteus*). Peut être même, pour un germe donné, y a-t-il action sur les mêmes métabolites, le filtrat y ajoutant son influence propre : absence, par destruction antérieure, de métabolites essentiels pour ce germe. Selon que l'on a synergie ou antagonisme du filtrat et de l'antibiotique, l'effet produit sur l'ensemencement est inhibition ou accroissement.

II. — Origine des agents infectieux

L'étude que nous venons de faire nous permet de dépasser le cadre des milieux vaccinés en envisageant les formes évolutives qu'ils peuvent engendrer. Elle s'intègre à un problème de biologie générale : l'origine des agents infectieux.

Nous ne sommes pas loin de penser avec nombre d'auteurs, Béchamp en particulier, que la bactérie a une origine cellulaire : cellule se détachant de son tissu originel, se dégradant progressivement par parasitisme pour donner les bactéries, être vivants réduits à une masse nucléaire plus ou moins bien individualiste, bordée d'un protoplasme et d'une membrane, et même, selon les vues de Charles Nicolle, se simplifiant en une macromolécule qu'est le virus incapable de vie propre. Il manquait, néanmoins, une preuve. La découverte des corps globuleux permet maintenant de fermer le cycle : la bactérie, dans certaines conditions de culture, donne un corps globuleux présentant une masse chromatique bien individualisée, une zone claire périphérique identifiable au cytoplasme et une membrane indiscutable (ce sont là tous les attributs de la cellule), pouvant donner naissance soit à des formes « L », si proches des rickettsies sinon des virus, soit faire retour à la bactérie originelle.

Les formes « L », elles mêmes, posent le problème de l'origine des virus. Si avec Charles Nicolle, comme nous le disions plus haut, on admet que les virus sont des bactéries dégradées à l'extrême, incapable de synthèse vivante, s'engrénant en quelque sorte dans une cellule, les formes « L » constituent peut-être un des stades dans cette dégradation adaptative. La recrudescence importante de certaines maladies à virus depuis les traitements

antibiotiques vient à notre sens étayer cette hypothèse : les germes ne pouvant se développer sous forme bactérienne mutent peut-être en virus en passant par divers stades dont celui des formes « L ». Il faudrait, évidemment pour confirmer ces vues retrouver des corps globuleux chez des sujets atteints d'affections diverses traitées par les antibiotiques. Mais comment pourrait-on distinguer une telle cellule bactérienne parmi les cellules de l'hôte, en particulier dans le sang ou les produits pathologiques ?

Le plus petit fait peut être le point de départ de vastes recherches, c'est une fois de plus le cas. Si nous avons marqué l'étendue du problème nous ne nous leurrerons pas sur la valeur de la simple esquisse que nous avons donné. Ce problème embrasse toutes les branches de la biologie. Il exige le travail en équipe de biologistes rompus aux techniques bactériologiques ou chimiques, même cytologiques. Nous disons cytologiques, ayant en vue les modifications profondes, spectaculaires signalées au cours de l'inhibition des bactéries homologues ou hétérologues ensemencées dans les filtrats purs ou additionnés de plasma, qui donnent des corps globuleux générateurs, très souvent de forme « L ». Après les travaux de Tulasne, Minck, Dienes. etc..., nous apportons une preuve de l'existence de nouveaux facteurs d'induction qui d'une bactérie, cytologiquement en apparence fort simple, fait une cellule véritable ; et quand ces cellules s'agglomérant, forment de véritables placards, un œil, même exercé, pourrait hésiter avant d'affirmer qu'il ne s'agit pas de cellules telles que les leucocytes mono et polynucléaires. ou même un fragment de tissu. Or nous pouvons, à notre gré, bien que nous ne connaissions pas encore les conditions exactes, faire apparaître

les formes évolutives ou les formes normales par la simple variation du taux de plasma dans le filtrat.

Nous regrettons vivement, limité par le temps et les possibilités d'expérimentation, de ne pouvoir apporter qu'une contribution expérimentale très modeste. de suggérer plutôt que de prouver dans un domaine où, d'ailleurs, les hypothèses sont encore plus nombreuses que les preuves.

BIBLIOGRAPHIE

ADRIANUS DE ZEEUW. (F). — Bijdrage tot de Kennis van het
het wezen en de toepassing van het antivirüs (Besredka).
Thèse médicale Utrecht 1932.

ALDERSHOFF (H). — Untersuchungen in vitro über die Art des
Besredkaschen antivirüs. Centralbl. f. Bakt. I. t. CXII
p. 273-1929.

BERDNIKOW (A). — Métabolisme azoté de quelques bactéries
et degré de vaccination des milieux. C.R. Soc. Biol. t. XCV.
26 juin 1926 p. 278.

BERTARELLI (E). — Uber antivirüs. Annals Tomarkin Foun-
dation. t. I p. 13 avril 1931.

BESREDKA. — Caractères des antivirüs. Bulletin de l'Institut
Pasteur. t. XVIII p. 50-57, janvier 1930.

DELAUNAY (A). — Action bactéricide et bactériolytique « in vi-
tro » des filtrats de culture du « B. subtilis » sur la bactériodie
charbonneuse. Revue d'Immunologie. t. XII p. 222-1948.

DIENES (L). — The significance of the larges bacteries and the
development of "L" type of colonies in bacterial cultures.
Journal of Bacteriology. t. XLIV, p. 37-1942.

DIENES (L). — The development of proteus cultures in the
presence of penicillin. Journal of the bacteriology. t. LVII
p. 529-1949.

FLOREY (H-W) — The use of microorganismes for therapeutie
purposes. Brit. med. J. p. 635, nov. 1945.

FREUDENREICH (E.) — De l'antagonisme des bactéries et
de l'immunité qu'il confère au milieu de culture. Annales de
l'Institut Pasteur. t. II p. 200, 1888.

HAJOS (K). — Beiträge zur Frage der Wachstumshemmenden
wirkung von Bouillon Kulturen. Centralbl. f. Bakt., I.
t. L. XXX VIII, p. 583, 1922.

- JANDASEK (L). — Dans quelle mesure l'antagonisme est-il influencé par l'adaptation au substrat : Schweiz-Zeitsch. f. Path. Bakt. t. XII, p. 128, 1949.
- KLIENEBERGER (E), NOBEL. -- Origin development and significance of « L » forms in bacterial cultures. Journal of général microbiology. t. III, p. 434, 1949.
- MOUREAU (M) et MOLLARÉT. — Action antagoniste « invitro » du filtrat de culture de bacille de Döderlein sur quelques bactéries. C. R. Soc. Biol. t. CILI, p. 897, 1947.
- MUTWEJEWSKY (B. G). — Über die nature des antivirüs. Centralbl. g. Bakt. I. t. CXII, p. 465, 1929.
- OESTERLIN (E. J). — Experimental studies with pyocyaneus filtrats. Journal of Immunology. t. XVI, p. 359, avril 1929.
- OKISCHIO (M). — De l'antivirüs pneumococcique et de son action sur la virulence du pneumo. Ann. Inst. Pasteur. t. XL. VIII, p. 344, 1932.
- PASTEUR. — Compte rendu de l'Académie des Sciences. t. II, p. 315, 1880.
- ROUX et CHAMBERLAND. — Sur l'immunité contre le charbon conférée par des substances chimiques. Ann. Inst. Pasteur. t. II, p. 406, 1888.
- SCHIOPPA (L). — Ricerche sperimentali intorno di caratteri di riconoscimento degli antivirüs. Boll. Inst. Sieroterap. Milan. t. XIII, p. 266 269, avril 1934.
- TULASNE (R). — Sur la production des formes submicroscopiques (formes filtrantes) par des bactéries de caractère banal et sur leur signification possible en pathologie infectieuse. Bulletin de l'Académie de Médecine. t. C XXXIII, p. 409, 1949.
- TULASNE (R). — Quelques données nouvelles sur la formation et les caractères de culture des formes L. du proteus vulgaris. C. R. Soci. de Biologie. t. CIL. IV. p. 1200, 1950.
- TULASNE (R). — Nouvelles observations sur les formes « L » des bactéries. Reproduction des formes « L ». Processus de la reversion des formes « L » en formes bactériennes normales. C. R. Soc. Biol. t. C ILV, p. 429, 1951.
-

SERMENT

En présence des Maîtres de cette Ecole, de mes chers condisciples et devant l'effigie d'Hippocrate, je promets et je jure, au nom de l'Etre suprême, d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine. Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail. Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe ; ma langue taira les secrets qui me seront confiés, et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime. Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ! Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque !

TABLE DES MATIÈRES

	Pages	
Introduction	11	
Chapitre I: Expériences		
A. — Milieux vaccinés et antibiotiques		
— Technique générale	16	
— Milieux vaccinés seuls	19	
— Milieux vaccinés et antibiotiques	21	
— Association de filtrats	28	
— Tableaux récapitulatifs	30	
B. — Action du milieu vacciné sur la morphologie des microbes		33
— Action des milieux vaccinés purs sur la morphologie des germes	34	
— Adjonction de plasma équin aux cultures filtrées de <i>Proteus</i>	36	
— Ensemencement des formes «L» en milieu normal	40	
Chapitre II: Conclusions de l'expérimentation		
— Milieux vaccinés seuls ou associés entre eux	43	
— Milieux vaccinés et antibiotiques	45	
— Action des milieux vaccinés sur la morphologie des microbes	49	
— Ensemencement des formes «L» sur milieu normal	52	
Chapitre III: Conclusions générales et hypothèses		
— Mode d'action des milieux vaccinés	54	
— Origine des agents infectieux	56	
— Bibliographie	59	

Vu :
Montpellier, le 21 juin 1951.

Le Doyen :
pour le Doyen,
l'Assesseur délégué
TURCHINI.

Jury: CARRÈRE
PAGÈS
JANBON
PASSOUANT

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Montpellier, le 23 juin 1951

Le Recteur,
GUILLON.

La Faculté de médecine de Montpellier déclare que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leur auteur ; qu'elle n'entend leur donner ni approbation ni improbation.

